



فصلنامه طب جنوب

پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر

سال شانزدهم، شماره ۳، صفحه ۲۲۴ - ۲۱۵ (پاییز ۱۳۹۲)

بررسی خشی کنندگی آنتی‌ونوم انستیتو رازی بر خصوصیات

بیولوژیک مار وپیرا لبتینای ایرانی

رامین سیدیدیان^{۱*}، سیدمهدی حسینی^۱، نیلوفر سیدیدیان^۲، سمیه غریبی^۱، نجمه سپاهی^۱، سحر ناصری‌نژاد^۱

ثریا قدرتی^۱، مهرزاد بحتوی^۳، حمیدرضا علیزاده اطاقور^۴، عباس زارع میرک‌آبادی^۵

^۱ مرکز تحقیقات زیست فناوری دریایی خلیج فارس، پژوهشکده زیست پزشکی خلیج فارس، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر

^۲ گروه بهداشت عمومی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

^۳ بخش داخلی، بیمارستان فاطمه زهرا، بوشهر

^۴ بخش جراحی، بیمارستان فاطمه زهرا، بوشهر

^۵ بخش جانوران سمی و تولید یاد زهر، مؤسسه تحقیقاتی و سرم سازی رازی، کرج

(دریافت مقاله: ۹۱/۳/۳۰ - پذیرش مقاله: ۹۱/۶/۱۵)

چکیده

زمینه: عوامل هموتوکسیک و نوروٹوکسیک موجود در ونوم مار می‌تواند سبب نکروز و از بین رفتن بافت گردد. مارگزیدگی در نقاط روستایی ایران در تمامی استان‌ها شایع بوده و می‌تواند باعث ادم، نکروز بافت و تغییرات خونی (در صورت وجود عامل هموتوکسیک) گردد. قدرت ونوم گرز مار (وپیرا لبتینا) ایرانی در ایجاد تأثیرات موضعی هموراژیک و ادماتوز در رت و نیز پروکواگولانت به‌همراه توان خشی نمودن موارد فوق به کمک آنتی‌ونوم پلی‌والانت آماده شده انستیتورازی به دو صورت انکوباسیون با ونوم قبل از تزریق و نیز در مطالعات خارج از بدن مورد بررسی قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها: دوزهای افزایشنده ونوم وپیرا لبتینا (۲، ۵ و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به‌صورت زیر پوستی به سطح پشتی گروه‌های سه‌گانه رت جهت اندازه‌گیری میزان متوسط دوز هموراژیک زده شد. در آزمایش دیگر جهت تعیین قدرت ادماتوزنیک مقادیر متفاوت ونوم (۱۰ تا ۱۵۰ میکروگرم) به‌صورت زیر پوستی (۱۰۰ میکرولیتر) به پای راست گروه‌های سه‌گانه رت زده شد و جهت کنترل از مقدار مساوی نرمال سالین در پای چپ استفاده گردید. جهت تعیین زمان انعقاد مقادیر مختلف از ونوم حل شده در ۵۰ میکرولیتر از نرمال سالین به ۲۰۰ میکرولیتر از پلاسما ی انسانی اضافه شده و زمان انعقاد اندازه‌گیری شد. آنتی ونوم انستیتو رازی در کلیه آزمایشات فوق جهت خشی‌سازی به‌کار برده شد. **یافته‌ها:** در بررسی حداقل دوز هموراژیک، پروکواگولانت و میزانی که می‌توانست ادم را در کف پای رت به‌میزان ۳۰ درصد افزایش دهد مقادیر ۸/۵، ۱/۱ و ۷۰ میکروگرم مشاهده گردید که بیانگر تأثیرات بالینی متفاوت این ونوم بود. با انکوباسیون ونوم و آنتی‌ونوم (۳۰ و ۲۰۰ میکرولیتر) قبل از تزریق، تأثیرات هموراژیک و پروکواگولانت از بین رفت و ویژگی‌های ادماتوزنیز با دوزهای افزایش‌یابنده آنتی‌ونوم کم‌اثر شد. تزریق داخل پری‌تنال آنتی‌ونوم نقش مؤثری در کاهش عوارض هموراژیک و ادماتوز در رت نداشت. تزریق دوزهای بالاتر ونوم به‌صورت داخل عضلانی با تأثیرات میونکروتیک همراهی داشت.

نتیجه‌گیری: بررسی کنونی، نشان دهنده قدرت آنتی‌ونوم انستیتو رازی در خشی نمودن تأثیرات هموراژیک و ادماتوز در محیط داخلی بدن و نیز لخته‌کنندگی در محیط آزمایشگاه بود. با توجه به وجود آنزیم‌های متعدد در ونوم مار وپیرا لبتینا لزوم انجام آزمایش‌های دیگر جهت بررسی آن‌ها به‌منظور تخلیص و جداسازی و نیز ارزیابی قدرت خشی‌کنندگی آنتی‌ونوم انستیتو رازی الزامی است.

واژگان کلیدی: ونوم، وپیرا لبتینا، آنتی‌ونوم انستیتو رازی، ایران

* بوشهر، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دریایی خلیج فارس، گروه فارماکولوژی و توكسیکولوژی

مقدمه

مارها برخلاف باورهای افسانه‌ای و نادرست که آن‌ها را به‌عنوان موجوداتی سمی و مرگ‌آور معرفی می‌کند، در کنار انسان‌ها زندگی کرده و تنها نزدیک به ۱۵ درصد از ۳۰۰۰ گونه مار شناخته شده در جهان برای انسان خطرناک می‌باشد. به‌عنوان نمونه در کشور هندوستان ۵۲ گونه زهردار و خطرناک وجود دارد (۱ و ۲).

مارهای سمی متعلق به چهار خانواده الپیده، وپیریده، هیدروفیده و آتراکتاسپیدیده می‌باشند که عموماً در مناطق خشک و گرم از قبیل خاورمیانه و کشورهایمانند ایران پراکنده هستند (۳).

در ایالات متحده آمریکا سالانه ۸۰۰۰ مورد گزش با مارهای سمی رخ می‌دهد که منجر به مرگ ۱۰ تا ۱۵ نفر می‌گردد (۴ و ۵). اما متأسفانه آمار دقیقی از موارد گزش و یا تلفات گزیدگی در ایران موجود نیست. تزریق پادزهر علاوه بر درمان‌های علامتی از دیرباز جهت مارگزیدگان به‌کار برده شده و در این راستا سازمان بهداشت جهانی، ارزیابی و استاندارد کردن آنتی‌ونوم‌های موجود در کشورهای مختلف را به‌عنوان یک هدف برگزیده است (۶). ونوم مارها همچون کژدم‌ها حاوی نوروٹوکسین و میوتوکسین و سایر آنزیم‌ها می‌باشد (۷). از میان مارهای سمی ایران می‌توان به وپیرا لبتینا با نام محلی گرزّه مار اشاره کرد که با عوارض متنوع از قبیل اختلالات انعقادی، خون‌ریزی خود به خودی، ادم، میونکروز و غیره همراه می‌باشد (۸ و ۹). در کشور ایران مصدومین مارگزیده به همراه درمان‌های شایع از تزریق سرم ضد مار پلی‌والان انستیتو رازی جهت از بین بردن عوارض و درمان سود می‌برند که قدرت شناسایی و خنثی سازی آن در مقابله با گزش مارهای بومی ایران با توجه به ماهیت این آنتی‌ونوم کمتر بررسی شده است.

هدف از این مطالعه، بررسی و مقایسه قدرت زهر مار وپیرا لبتینا جهت ایجاد ادم، خون‌ریزی زیر پوستی، نکروز عضلانی و در آخر قدرت کواگولانت آن می‌باشد. در مرحله دیگری از بررسی قدرت خنثی کنندگی آنتی‌ونوم انستیتو رازی در از بین بردن تأثیرات فوق با تزریق آن همراه با ونوم بررسی خواهد شد.

مواد و روش‌ها

ونوم و حیوانات آزمایشگاهی

ونوم لیوفلیزه مار وپیرا لبتینا صید شده در مناطق مختلف ایران از بخش جانوران سمی انستیتو رازی کرج تهیه و در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد. قبل از استفاده ونوم در نرمال سالین با غلظت یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر حل شد. آنتی‌ونوم پلی‌والان ضد مار انستیتو رازی با حجم ۱۰ میلی‌لیتر که از تصفیه و تغلیظ پلاسما ی اسب تهیه شده و زهر شش نوع از مارهای بومی و خطرناک ایران (*Pseudocerastes persicus*, *Agkistrodon halys*, *Vipera albicornuta*, *Echis carinatus*, *Vipera lebetina*, *Naja naja Oxiana*) را خنثی می‌کند از همان مکان تهیه گردید. تمامی رت‌های مورد آزمایش نر و از نژاد ویستار با وزن 250 ± 50 گرم بودند. کلیه حیوانات در قفس‌های استاندارد در خانه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی بوشهر نگهداری شدند.

مشخص نمودن محتوای پروتئینی

درصد پروتئینی ونوم مار وپیرا لبتینا با روش رنگ سنجی براد فورد (۱۰) تعیین و برابر ۱/۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود.

تعیین فعالیت هموراژیک

فعالیت هموراژیک موضعی ونوم با روش کوندوو همکاران به دست آمد (۱۱). ابتدا رت‌ها به گروه‌های سه تایی تقسیم شدند. به رت‌های یک گروه نرمال سالین به صورت زیر پوستی به میزان صد میکرولیتر پس از بیهوشی خفیف با اتر در ناحیه پشتی حیوان که قبلاً تراشیده شده بود به عنوان کنترل منفی تزریق شد. سپس دوزهای مختلف از ونوم لیوفیلیزه شده (۲/۵ تا ۵۰ میکروگرم) از مار فوق درصد میکرولیتر نرمال سالین حل شد و به سایر گروه‌ها تزریق گردید. ۲۴ ساعت بعد رت‌ها با تزریق کتامین در ناحیه پریتونئال قربانی شده و سطح داخلی پوست آن‌ها از جهت ایجاد محدوده خونریزی در دو جهت که بیشترین میزان را ایجاد کردند در بین دو لام شیشه‌ای در حالتی که پوست کشیده نشده بود بازبینی شد. دو محور که بیشترین میزان خونریزی در آن‌ها دیده شده بود به کمک خط‌کش و کولیس اندازه‌گیری شد و میانگین حسابی آن‌ها در مورد هر رت محاسبه گردید. دوز متوسط خونریزی دهنده برابر میزانی از ونوم بود که می‌توانست خونریزی برابر یک سانتی‌متر ایجاد کند.

تعیین فعالیت ادماتوز ونوم

این پارامتر از روش لمونت^۱ با اندکی تغییرات به دست آمد (۱۲ و ۱۳). دوزهای مختلف از ونوم حل شده در صد میکرولیتر از نرمال سالین در پای راست گروه‌هایی شامل سه رت پس از بیهوشی خفیف با اتر در منطقه کف پا تزریق شده و در پای چپ همان حجم از نرمال سالین به عنوان کنترل تزریق گردید. بعد از ۲۴ ساعت رت‌ها با داروی بیهوشی کشته شده و هر دو پا از محل قوزک با قیچی قطع گردیده و با ترازوی

دیجیتال EK-3000 وزن شدند. حداقل دوز ادماتوز برابر میزانی بود که می‌توانست به اندازه ۳۰ درصد اختلاف در وزن دو پا ایجاد کند.

تعیین فعالیت پروکواگولانت ونوم

حداقل دوز پروکواگولانت برابر میزانی (وزن خشک ونوم با واحد میلی‌گرم) قرار گردید که می‌توانست خون انسانی سیترا ته را در مدت زمان ۶۰ ثانیه لخته نماید (۶). ابتدا پلاسمای تازه انسانی که توسط سیترات سدیم سه درصد تهیه شده بود و آزمون‌های انعقادی آن نیز نرمال بودند ($PT=12$ و $PTT=35$) از سازمان انتقال خون تهیه گردید. سپس غلظت‌های متفاوت از ونوم (یک دهم و ۱/۱ و ۱/۱۰ و ۱/۱۰۰ و ۱/۱۰۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در نرمال سالین تهیه شده و میزان ۵۰ میکرولیتر از آن‌ها را پس از به حجم رساندن به ۲۰۰ میکرولیتر از خون سیترا ته سه درصد در نمونه‌های سه تایی اضافه گردید و سپس زمان لازم برای لخته شدن در دمای $37^{\circ}C$ به کمک کرومومتر محاسبه شد. در کلیه آزمایش‌ها پلاسمای سیترا ته به همراه فسفات بافر سالین به عنوان کنترل کنار گذاشته شد.

خنثی‌سازی فعالیت هموراژیک و ادماتوز سم‌های

مزبور با آنتی‌ونوم انسیتو رازی

در این بررسی ابتدا مقادیر مختلف از آنتی‌ونوم را با دوز ثابت ونوم در دمای $37^{\circ}C$ به مدت زمان سی دقیقه انکوبه کرده سپس میزان صد میکرولیتر از محلول به صورت زیر پوستی تزریق گردید. ۲۴ ساعت بعد موش‌ها به کمک تزریق با دوز بالای کتامین قربانی شده و میزان خونریزی در سطح داخلی پوست در دو محور اندازه‌گیری شد. در آزمایشی جداگانه همراه با تلقیح زیر پوستی ونوم، دوزهای متفاوت آنتی‌ونوم به صورت داخل پریتونئال تزریق گردید. جهت بررسی

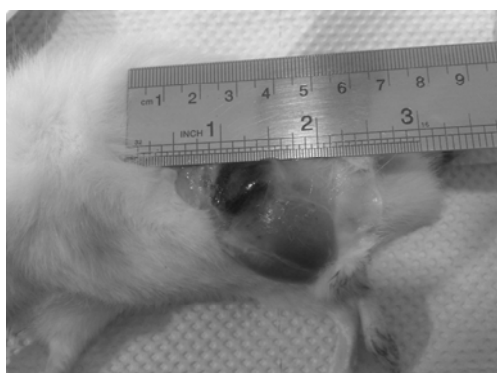
^۱ Lomonte

یافته‌ها

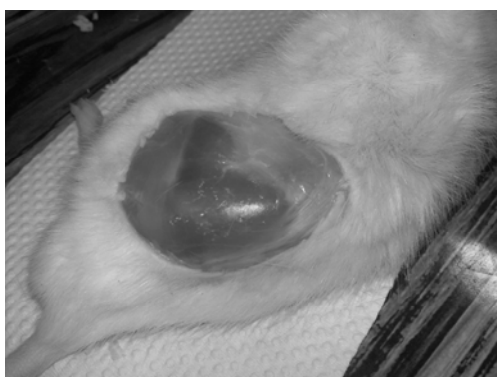
میزان خونریزی ایجاد شده به دنبال تزریق و

خشتی‌سازی آن به کمک آنتی ونوم انسیتورازی

بیست و چهار ساعت پس از تزریق زیر پوستی ونوم وپیرا لبتینا به رت با خونریزی قابل ملاحظه نسبت به کنترل (تزریق نرمال سالین) روبرو بودیم (شکل الف در مقابل ب).



شکل الف) تأثیر هموراژیک تزریق زیرپوستی ونوم وپیرا لبتینا به رت



شکل ب) تأثیر تزریق زیرپوستی نرمال سالین به عنوان کنترل منفی در رت

سه برابر دوز هموراژیک ونوم با مقادیر مختلف آنتی ونوم در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت زمان ۳۰ دقیقه انکوبه شده و میزان خونریزی ماکروسکوپی بعد از گذشت بیست و چهار ساعت با قربانی کردن حیوان به کمک اتر به دست آمد. با قرار دادن میزان متوسط خونریزی نسبت به دوز

قابلیت خشتی کنندگی آنتی ونوم بر روند ادماتوز دوز ثابت ونوم با مقادیر متفاوت آنتی ونوم در دمای اتاق به مدت زمان سی دقیقه انکوبه شده و سپس صد میکرولیتر در پای راست گروه‌های سه گانه رت تزریق شد. تزریق آنتی ونوم به تنهایی و نرمال سالین به عنوان کنترل منفی صورت پذیرفت. در این آزمایش تغییر میزان ادم ارزیابی شد.

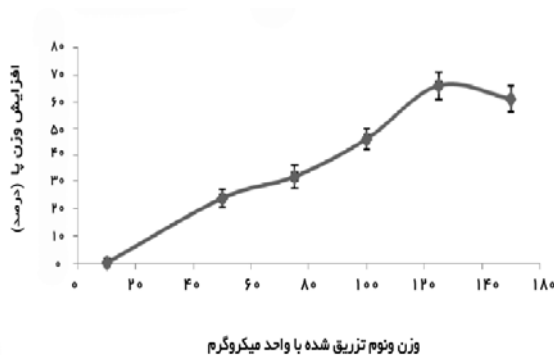
خشتی‌سازی فعالیت پروکواگولانت وپیرا لبتینا

خشتی‌سازی فعالیت پروکواگولانت با استفاده از روش لانگ (Laing) و همکاران با تغییرات انجام شد (۱۴). مقدار محاسبه شده قبلی از ونوم (۱/۱ میکروگرم) با میزان‌های متفاوت از آنتی ونوم (۵۰ تا ۲۵۰ میکرولیتر) پس از به حجم رساندن با فسفات بافر سالین به مدت زمان ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر پلاسمای سیترا ته و کلرید کلسیم به آن اضافه شد. زمان لخته شدن به کمک کرومومتر در نمونه‌های سه تایی اندازه‌گیری گردید. در نمونه‌های کنترل، پلاسمای ونوم و آنتی ونوم انسیتورازی و یا نرمال سالین به تنهایی مخلوط شدند. خشتی‌سازی به میزانی از آنتی بادی گفته شد که در آن زمان لخته شدن در مقایسه با کمترین میزان دوز لخته کننده سه برابر شد (۱۵).

اصول کاربرد آمارزیستی

در بررسی آماری و کشیدن نمودارها از نرم افزار EXCEL و SPSS (USA, IL, Chicago, SPSS Inc) ویرایش ۱۱/۵ استفاده شده است و داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شده‌اند. در بررسی گروه‌های دوتایی از t-test و چند تایی از ANOVA به همراه tuckey استفاده شده است. ($P < 0.05$).

نمودن آنتی‌ونوم و ونوم تا حدود قابل ملاحظه‌ای از ادم کاست (۷۸ به ۳۸ درصد).



نمودار (۱) متوسط تغییرات ادماتوز ایجاد شده در گروه‌های سه تایی رت با تزریق مقادیر متفاوت ونوم و پیرا لبتینا

تزریق شده مقدار ۸/۵ میکروگرم به‌عنوان متوسط دوز خون‌ریزی دهنده مشخص شد (جدول ۱). در این آزمایش نکرور واضح ماکروسکوپی با تغییر رنگ ارغوانی محل تزریق داخل عضلانی نمونه‌های وزنی متفاوت ونوم (۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰) در تزریقات به گروه‌های سه‌گانه رت دیده شد.

دوزهای افزاینده از آنتی‌ونوم (۵۰ تا ۲۰۰ میکرولیتر) به‌صورت اینتراپرتونال پس از تزریق زیر پوستی ونوم به گروه‌های سه‌گانه رت تزریق شد ولی در هیچ‌کدام از آن‌ها خون‌ریزی زیر پوستی به‌طور کامل از بین نرفت.

میزان ادم کف پای ایجاد شده و خنثی‌سازی آن به‌کمک آنتی‌ونوم انستیتو رازی

بیست و چهار ساعت پس از تزریق مقادیر مختلف ونوم در مقابل نرمال سالین در پای مقابل گروه‌های سه‌گانه رت با ادم قابل ملاحظه در کف پا روبرو شدیم (نمودار ۱). در آزمایشی جداگانه حداقل دوز ایجاد کننده ادم (۷۰ میکروگرم) را با مقادیر مختلف آنتی‌ونوم (۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرولیتر) مجاور کرده و میزان ۱۰۰ میکرولیتر پس از سی دقیقه انکوباسیون به گروه‌های سه‌گانه رت تزریق شد. در آزمایشی دیگر از تزریق مقدار برابر آنتی‌ونوم استفاده گردید. ترکیب

قدرت کواگولانت ونوم و خنثی شدن آن توسط

آنتی‌ونوم انستیتو رازی

با توجه به انجام آزمایش ۵۲/۴ میکروگرم از پودر لیوفیلیزه ونوم و پیرا لبتینا توانست خون انسانی سیترا ته را در مدت زمان ۶۰ ثانیه لخته نماید. در بررسی انجام شده با آنتی‌ونوم انستیتو رازی با مخلوط کردن و انکوبه نمودن در دمای ۳۷ درجه، میزان ۲۰۰ میکرولیتر از آنتی‌ونوم انستیتو رازی توانست زمان لخته شدن را سه برابر کند (جدول ۱).

جدول ۱) مقادیر حداقل دوز هموراژیک، کواگولانت و ادماتوز مار و پیرالبتینا به‌همراه میزان خنثی‌کننده آنتی‌ونوم انستیتو رازی

حد اقل دوز خون‌ریزی دهنده (میکروگرم)	حد اقل دوز پروکواگولانت (میکروگرم)	دوز ادماتوزیک (میکروگرم)	دوز خنثی‌کننده آنتی‌ونوم (میکرولیتر)	ونوم
۸/۵	۱/۱	۷۰	۳۰	۲۰۰

بحث

دو دسته نورو توکسیک (آسیب‌رسانی و یا نابودی بافت عصبی) و هموتوکسیک (آسیب‌رسانی به بافت‌ها

ونوم موجود در مارهای سمی در یک برآورد کلی به

و خون) تقسیم‌بندی می‌شوند. افراد مار گزیده با علائمی از قبیل درد و تورم در محل گزش، وجود فنگ (جای دندان‌های مار) در آن محل، کواگولوپاتی‌های خفیف و یا شدید، نارسایی کلیه و در آخر شوک روبرو می‌شوند (۱۵).

امروزه بی‌حرکت کردن عضو مار گزیده و نیز بستن قسمت بالای عضو با فشار کم به نحوی که مانع از رسیدن خون شریانی به آن موضع و در نتیجه افزایش نکروز نشود تا رسیدن خدمات اورژانس پیشنهاد می‌گردد. استفاده از آنتی‌وین اسبی مدت زمان مدیدی است که جهت درمان ۷۵ درصد از گزش‌های خطرناک در آمریکا مورد استفاده قرار می‌گیرد و این امر با توجه به زمان کم رسیدن بیمار به بیمارستان (کمتر از دو ساعت) در درمان نقش مؤثری به عهده دارد (۱۸-۱۶).

مار ماکروویپرا لبتینا متعلق به خانواده ویپریده بوده و در شمال آفریقا و منطقه خاورمیانه از جمله ایران تا قسمت کشمیر پراکندگی جغرافیایی دارد. این مار در ایران به نام گرزه مار خوانده شده و یکی از بزرگترین مارهای سمی موجود در اکثر مناطق کوهستانی، و علف‌زاری ایران است که دارای سری صاف، مثلثی و جدا از گردن بوده نیز در دمای بالای ۴۵ درجه سلسیوس در پناه درختان خود را مخفی می‌کند (۱۹).

یکی از مشخصات بارز گزیدگی با مارهای گروه ویپرینه خون‌ریزی می‌باشد که از جمله علل اصلی آن تأثیر پروتئازهایی با منشا متالوآنزیم بر جدار عروق است (۲۰). میزان متوسط دوز خونریزی دهنده در آزمایشات این بررسی بر روی رت در مورد گونه ایرانی برابر ۸/۵ میکروگرم بود که در مقایسه با مار جعفری^۲ موجود در ایران قدرت بیشتری را از خود نشان می‌داد (۸/۵ میکروگرم در مقابل ۱۴ و ۴۶/۵) (۶).

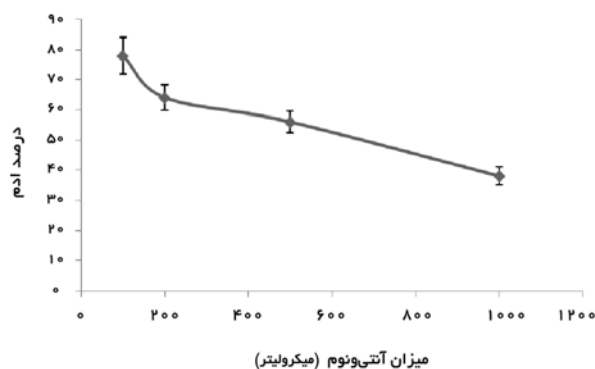
اکثریت عوامل مؤثر بر خواص هموراژیک زهر مار دارای وزن مولکولی بالای ۲۰ کیلو دالتون هستند که از توان تولید آنتی‌بادی بالایی در اسب برخوردار می‌باشند. برای ارزیابی تأثیرات خنثی‌کنندگی آنتی‌ونوم انستیتو رازی به‌عنوان درمان شایع مار گزیدگی در کشورمان مقادیر متفاوت از این پادزهر را با ونوم مخلوط شد و بعد از انکوباسیون و تزریق نشان داده شد که ۳۰ میکرولیتر می‌تواند به‌صورت کامل مانع از خون‌ریزی زیر پوستی پس از ۲۴ ساعت از تزریق حداقل دوز هموراژیک گردد.

بر این اساس می‌توان آنتی‌ونوم انستیتو رازی را به‌عنوان یک آنتی‌ونوم با قدرت نسبتاً خوب جهت خنثی نمودن قابلیت هموراژیک بر اساس مخلوط کردن آن با ونوم دانست. نکته قابل توجه آن است که خون‌ریزی زیر پوستی در ناحیه مار گزیدگی پدیده‌ای است که به سرعت رخ داده و در بعضی از گونه‌ها حتی پس از ۳۰ دقیقه رخ می‌دهد و با توجه به میزان جذب داخل خونی محدود به‌دنبال تزریق داخل پریتوئن دوزهای افزاینده آنتی‌ونوم همزمان با تزریق در آزمایش ما نمی‌توان به‌صورت کامل مانع از ایجاد خون‌ریزی گردید. گوتیرز (Gutiérrez) و همکاران در مورد خنثی‌سازی سم (Terciopolo) *Bothrops Asper* به‌کمک آنتی‌ونوم موجود در کشور کستاریکا به این نتیجه رسیدند که تأثیر خنثی‌سازی ونوم و آنتی‌ونوم قبل از تزریق بر خاصیت همولیتیک و ادماتوز بسیار بیشتر از تزریق وریدی همزمان آن است (۲۳ و ۲۴).

علت این امر را می‌توان در سرعت بالای انتشار ونوم دانست که حتی با تزریق همزمان وریدی نمی‌توان به‌صورت کامل این امر را خنثی نمود. در بررسی‌کنونی تزریق آنتی‌ونوم به‌صورت پریتونئال صورت پذیرفت و

^۲ Echis carinatus

میکرولیتر نرمال سالین استفاده شد. انکوباسیون ونوم با مقادیر متفاوت آنتی ونوم توانست ادم ایجاد شده را تا حد کمی بکاهد. ادم پدیده پیچیده‌ای است که به عوامل و مدیاتورهای مختلفی همچون آزاد شدن هیستامین و سروتونین از ماست سل‌ها به وسیله کینین‌ها و متابولیت‌های لیپوآکسی ژناز ارتباط دارد (۲۵). در مورد ونوم و وپرا لبتینا قدرت آنتی ونوم انستیتو رازی در خنثی نمودن تأثیر ادماتوز نشان داده شده است (نمودار ۲) و با انکوباسیون ۱۰۰۰ میکرولیتر درصد ادم به ۳۸ درصد کاهش پیدا کرد. این امر در مورد سایر گونه‌های مار نیز مشابه بوده و مثلاً در یک مطالعه در مورد *Bothrops asper* در هنگام انکوبه کردن ونوم و آنتی ونوم با اعدادی مشابه روبرو می‌شویم (۲۶).



نمودار ۲) تأثیرات انکوباسیون ونوم و وپرا لبتینا و آنتی ونوم انستیتو رازی به مدت زمان نیم ساعت قبل از تزریق بر میزان ادم کف پای در گروه‌های سه گانه رت

نکته مهم و اساسی آن بود که با تزریق مقادیر یکسان آنتی بادی یک ساعت بعد در میزان ادم به وجود آمده تغییر آماری معنی‌داری مشاهده نشد که می‌تواند مربوط به مشخصات فارماکوکینتیک سم و نیز سرعت اثربخشی آن در ایجاد پدیده ادم باشد. این امر لزوم بررسی و تزریق هر چه سریع‌تر آنتی ونوم را یادآور می‌کند (۲۷).

نتوانست حتی با دوز ۲۰۰ میکرولیتر به صورت کامل جلوی خون‌ریزی زیر پوستی را بگیرد که یکی از علل اصلی آن می‌تواند میزان جذب داخل خون کم آن باشد. به هر حال نیاز به انجام بررسی با تزریقات وریدی جهت نشان دادن قدرت خنثی‌کنندگی و یا مجاور کردن با ید رادیواکتیو جهت بررسی توزیع بافتی و به دست آوردن فاکتورهای کینتیک ونوم و آنتی ونوم احساس می‌شود.

در این بررسی جهت تعیین حداقل دوز پروکواگولانت در مورد این مار میزان ۱/۱ میکروگرم از ونوم موجود در ۵۰ میکرولیتر قادر بود پلاسمای سیتراته را در عرض ۶۰ ثانیه لخته نماید. در مقایسه با سایر مارها از قبیل *B. schlegelli* مار وپرا لبتینا از قدرت بالایی برخوردار است و از جمله مارهایی که قابلیت رقابت در این زمینه را با کفچه مار دارند مار جعفری ایرانی می‌باشد (۶) (۲/۲ میلی گرم در لیتر در مقابل ۲ میلی گرم در لیتر). در هنگام انکوباسیون دو برابر دوز کواگولانت ونوم با مقادیر متفاوت حجمی آنتی ونوم میزان ۲۰۰ میکرولیتر توانست مدت زمان انعقاد را سه برابر افزون کند و به عنوان دوز خنثی کننده محسوب شد.

با توجه به آن که اختلال انعقادی منتشر یکی از اتفاقات شایع به دنبال مارگزیدگی در حیوانات و انسان است ونوم گرز مار بر خلاف مار قهوه‌ای^۳ با انکوباسیون به مدت زمان نیم ساعت قابلیت پروکواگولانت خود را تا حدود زیادی از دست داد و این بیانگر کارآیی خوب آنتی ونوم انستیتو رازی در خنثی نمودن این خاصیت می‌باشد (۲۴).

در بررسی ما حداقل دوز ادماتوز ونوم که می‌توانست افزایش وزن ۳۰ درصد در کف پا ایجاد کند برابر ۷۰ میکروگرم بود و جهت کنترل از تزریق ۱۰۰

^۳ P. textilis

سیاس و قدردانی

این پژوهش در خانه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی

بوشهر و با حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی آن دانشگاه انجام گرفته است.

References:

1. Meenatchisundaram S, Parameswari G, Michael A, et al. Neutralization of the pharmacological effects of Cobra and Krait venoms by chicken egg yolk antibodies. *Toxicon* 2008; 52: 221-7.
2. Bawaskar HS. Snake venoms and antivenoms: critical supply issues. *J Assoc Physicians India* 2004; 52: 11-3.
3. Ismail M, Memish ZA. Venomous snakes of Saudi Arabia and the Middle East: a keynote for travellers. *Int J Antimicrob Agents* 2003; 21: 164-9.
4. Parrish HM. Incidence of treated snakebites in the United States. *Public Health Rep* 1966; 81: 269-76.
5. Hutton RA, Warrell DA. Action of snake venom components on the haemostatic system. *Blood Rev* 1993; 7: 176-89.
6. Theakston RD, Reid HA. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. *Bull World Health Organ* 1983; 61: 949-56.
7. Farahmandzad A, Sarvari R, Ebrahimi F, et al. Differential comparison on protein components of the venoms obtained from two species of the Iranian endemic scorpions, Buthidae family. *ISMJ* 2012; 15: 85-92.
8. Mohapatra BN, Nayak K, Rath RN. Coagulation disorder following viper bite in Orissa. *J Indian Med Assoc* 1992; 90: 12-4.
9. Melo PA, do Nascimento MC, Mors WB, et al. Inhibition of the myotoxic and hemorrhagic activities of crotalid venoms by *Eclipta prostrata* (Asteraceae) extracts and constituents. *Toxicon* 1994; 32: 595-603.
10. Kruger NJ. The Bradford method for protein quantitation. In: Walker JM, editor. *The protein protocols handbook*. 2nd ed. NJ: Humana Press; 2002: p. 15-21.
11. Kondo H, Kondo S, Ikezawa H, et al. Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. *Jpn J Med Sci Biol* 1960; 13: 43-52.
12. Lomonte B, Tarkowski A, Hanson LA. Host response to *Bothrops asper* snake venom. Analysis of edema formation, inflammatory cells, and cytokine release in a mouse model. *Inflammation* 1993; 17: 93-105.
13. Chandrashekara KT, Nagaraju S, Nandini SU, et al. Neutralization of local and systemic toxicity of *Daboia russelii* venom by *Morus alba* plant leaf extract. *Phytother Res* 2009; 23: 1082-7.
14. Laing GD, Theakston RD, Leite RP, et al. Comparison of the potency of three Brazilian *Bothrops* antivenoms using in vivo rodent and in vitro assays. *Toxicon* 1992; 30: 1219-25.
15. Gené JA, Roy A, Rojas G, et al. Comparative study on coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa Rican crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. *Toxicon* 1989; 27: 841-8.
16. Juckett G, Hancox JG. Venomous snakebites in the United States: management review and update. *Am Fam Physician* 2002; 65: 1367-74.
17. Dart RC, McNally J. Efficacy, safety, and use of snake antivenoms in the United States. *Ann Emerg Med* 2001; 37: 181-8.
18. Beebe DK. Abnormal Vaginal bleeding. In: Rakel R, editor. *Saunders manual of medical practice*. 1st ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company; 1996.
19. Johnson CA. Management of snakebite. *Am Fam Physician* 1991; 44: 174-80.
20. Reid HA. Symptomatology, pathology, and treatment of land snake bite in India and Southeast Asia. In: Bucherl W, Buckley E, Deulofeu V, et al, editors. *Venomous Animals and Their Venoms*. 1st ed. New York: Academic Press; 1968: p. 611-42.
21. Bjarnason JB, Fox JW. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacol Ther* 1994; 62: 325-72.
22. Tu AT. *Venoms: chemistry and molecular biology*. 1st ed. Michigan: John Wiley & Sons Inc; 1977: p. 325-327.
23. Gutiérrez JM, Chaves F, Bolaños R, et al. Neutralization of local effects of *Bothrops asper* venom by polyvalent antivenin. *Toxicon* 1981; 19: 493-500.
24. Gutiérrez JM, Gené JA, Rojas G, et al. Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. *Toxicon* 1985; 23: 887-93.

25. Masci PP, Whitaker AN, De Jersey J. Purification and characterization of a prothrombin activator from the venom of the Australian brown snake, *Pseudonaja textilis*. *Biochem Int* 1988; 17: 825-35.
26. de Faria L, Antunes E, Bon C, et al. Pharmacological characterization of the rat paw edema induced by *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom. *Toxicon* 2001; 39: 825-30.
27. Rucavado A, Lomonte B. Neutralization of myonecrosis, hemorrhage, and edema induced by *Bothrops asper* snake venom by homologous and heterologous pre-existing antibodies in mice. *Toxicon* 1996; 34: 567-77.
28. Chaves F, Barboza M, Gutiérrez JM. Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo) in mice. *Toxicon* 1995; 33: 31-9.

Original Article

Neutralization effects of Iranian *Vipera lebetina* biological properties by Razi institute antivenom

R. Seyedian ^{1*}, SM. Hosseini ¹, N.Seyyedian ², S. Gharibi ¹, N. Sepahy ¹,
S. Naserinejad ¹, S. Ghodrati ¹, M. Bahtouee ³, HR. Alizadeh Otaghvar ⁴,
A. Zare Mirak Abadi ⁵

¹The Persian Gulf Marine Biotechnology Research Center, The Persian Gulf Biomedical Research Center, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, IRAN

²Department of Public Health, School of Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, IRAN

³Department of Internal Diseases, Fatemeh Zahra Hospital, Bushehr, IRAN

⁴Department of Surgery, Fatemeh Zahra Hospital, Bushehr, IRAN

⁵Department of Venomous Animals and Antivenom Production, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, IRAN

(Received 18 Jun, 2012 Accepted 5 Sep, 2012)

Abstract

Background: The hemotoxic and neurotoxic factors of snake venoms is the main responsible for necrosis and tissue sloughing. Envenomations are common in rural areas in all provinces of Iran caused by snake species which causes local swelling, ecchymosis and alterations in blood profile in case of hemotoxic venom. In this study some in vivo and in vitro properties (Hemorrhagic, edematogenic and coagulant) of Iranian *Vipera lebetina* venom in addition to neutralizing capacity of pepsin derived Razi Institute polyvalent antivenin were assayed.

Material and Methods: Escalating doses of *Vipera lebetina* venom dissolved in Normal saline (2.5-50 µg/ml) were injected (100µl) subcutaneously to dorsal area of rats (n=3) to investigate mean hemorrhagic amount after 24 hours. Groups of three mice were injected subcutaneously in the right foodpad with various amounts of venom (10-150µg). The left foodpad received the same amount (100µl) of normal saline alone (negative control) to evaluate the edematogenic property of this venom. To determine the coagulant activity, various amounts of venom dissolved in normal saline (50µl) were added to human plasma (200µl) and coagulation time was measured. Razi Institute antivenom was used for neutralization of all three measured biological parameters.

Results: Mean hemorrhagic, procoagulant and edematous amounts (increasing 30% in hind paw edema) were 8.5, 1.1 and 70 microgram, respectively. Preincubation with polyvalent antibody (30 and 200 microliter) decreased hemorrhagic and procoagulant activity. Edematogenic property of this venom decreased significantly by incubation with antivenom (78% to 38% by incubation with 1000 microliter of polyvalent antivenom). Intra peritoneal injection of this remedy following envenomation had no effect in relieving symptoms. Myonecrotic effects were seen by intramuscular injection of *Vipera lebetina* venom in rats.

Conclusion: Our study shows that Iranian antivenom could neutralize some in vivo and in vitro hazardous effects of envenomation by this snake like hemorrhagic, edematogenic and procoagulant properties that paves the way for separation and purification of multiple enzymes present in this venom to investigate the neutralizing capacity from Razi Institute polyvalent antivenom.

Keywords: venom, *Vipera lebetina*, Razi institute antivenom, Iran

*Address for correspondence: The Persian Gulf Marine Biotechnology Research Center, The Persian Gulf Biomedical Research Center, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, IRAN; E-mail: r.seyedian@bpums.ac.ir